

Kis extracelluláris vezikulák, mint a tumorsejtek stresszválaszainak közvetítői

Doktori értekezés tézisei

Harmati Mária

Témavezető:

Dr. Buzás Krisztina

Szegedi Tudományegyetem, Fogorvostudományi Kar

Szegedi Biológiai Kutatóközpont



Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola,
Általános Orvostudományi Kar, Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2019

Az értekezés alapját képező közlemények:

- I. **Harmati M**, Tarnai Z, Decsi G, Kormondi S, Szegletes Z, Janovak L, Dekany I, Saydam O, Gyukity-Sebestyen E, Dobra G, Nagy I, Nagy K, Buzas K. Stressors alter intercellular communication and exosome profile of nasopharyngeal carcinoma cells. *J Oral Pathol Med.* **46**, 259-266, DOI: <https://doi.org/10.1111/jop.12486> (2017).

IF 2,237; Q2

- II. **Harmati M**, Gyukity-Sebestyen E, Dobra G, Janovak L, Dekany I, Saydam O, Hunyadi-Gulyas E, Nagy I, Farkas A, Pankotai T, Ujfaludi Zs, Horvath P, Piccinini F, Kovacs M, Biro T, Buzas K. Small extracellular vesicles convey the stress-induced adaptive responses of melanoma cells. *Sci Rep.* **9**, 15329; DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51778-6> (2019).

Becsült IF 4,011; Q1

Egyéb publikációk:

- III. Buzas K, Marton A, Vizler C, Gyukity-Sebestyen E, **Harmati M**, Nagy K, Zvara A, Katona RL, Tubak V, Endresz V, Nemeth IB, Olah J, Vigh L, Biro T, Kemeny L. Bacterial sepsis increases survival in metastatic melanoma: *Chlamydophila pneumoniae* induces macrophage polarization and tumor regression. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 862-865. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.12.032> (2016).

IF 6,287; Q1

- IV. **Harmati M**, Gyukity-Sebestyen E, Dobra G, Terhes G, Urban E, Decsi G, Mimica-Dukic N, Lesjak M, Simin N, Pap B, Nemeth IB, Buzas K. Binary mixture of *Satureja hortensis* and *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oils: *in vivo* therapeutic efficiency against *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* **22**, e12350; DOI: <https://doi.org/10.1111/hel.12350> (2017).

IF 4,123; Q1

- V. Zsedenyi A, Farkas B, Abdelrasoul GN, Romano I, Gyukity-Sebestyen E, Nagy K, **Harmati M**, Dobra G, Kormondi S, Decsi G, Nemeth IB, Diaspro A, Brandi F, Beke S, Buzas K. Gold nanoparticle-filled biodegradable photopolymer scaffolds induced muscle remodeling: *in vitro* and *in vivo* findings. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **72**, 625-630. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.124> (2017).

IF 5,080; Q1

- VI. Decsi G, Soki J, Pap B, Dobra G, **Harmati M**, Kormondi S, Pankotai T, Braunitzer G, Minarovits J, Sonkodi I, Urban E, Nemeth IB, Nagy K, Buzas K. Chicken or the Egg: Microbial Alterations in Biopsy Samples of Patients with Oral Potentially Malignant Disorders. *Pathol Oncol Res.* **25**, 1023-1033. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0457-x> (2019).

Becsült IF 2,433; Q2

- VII. Körmöndi S, Terhes G, Pal Z, Varga E, **Harmati M**, Buzas K, Urban E. Human Pasteurellosis Health Risk for Elderly Persons Living with Companion Animals. *Emerg Infect Dis.* **25**, 229-235. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2502.180641> (2019).

Becsült IF 7,185; Q1

- VIII. Gyukity-Sebestyen E, **Harmati M**, Dobra G, Nemeth I B, Mihaly J, Zvara Á, Hunyadi-Gulyas E, Katona R, Nagy I, Horvath P, Balind A, Szkalitsity A, Kovacs M, Pankotai T, Borsos B, Erdelyi M, Szegletes Zs, Vereb Z, Buzas E I, Kemeny L, Biro T, Buzas K. Melanoma-Derived Exosomes Induce PD-1 Overexpression and Tumor Progression via Mesenchymal Stem Cell Oncogenic Reprogramming. *Front. Immunol.* **10**, 2459; DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02459> (2019).

Becsült IF 4,716; Q1

Összesített IF 36,072

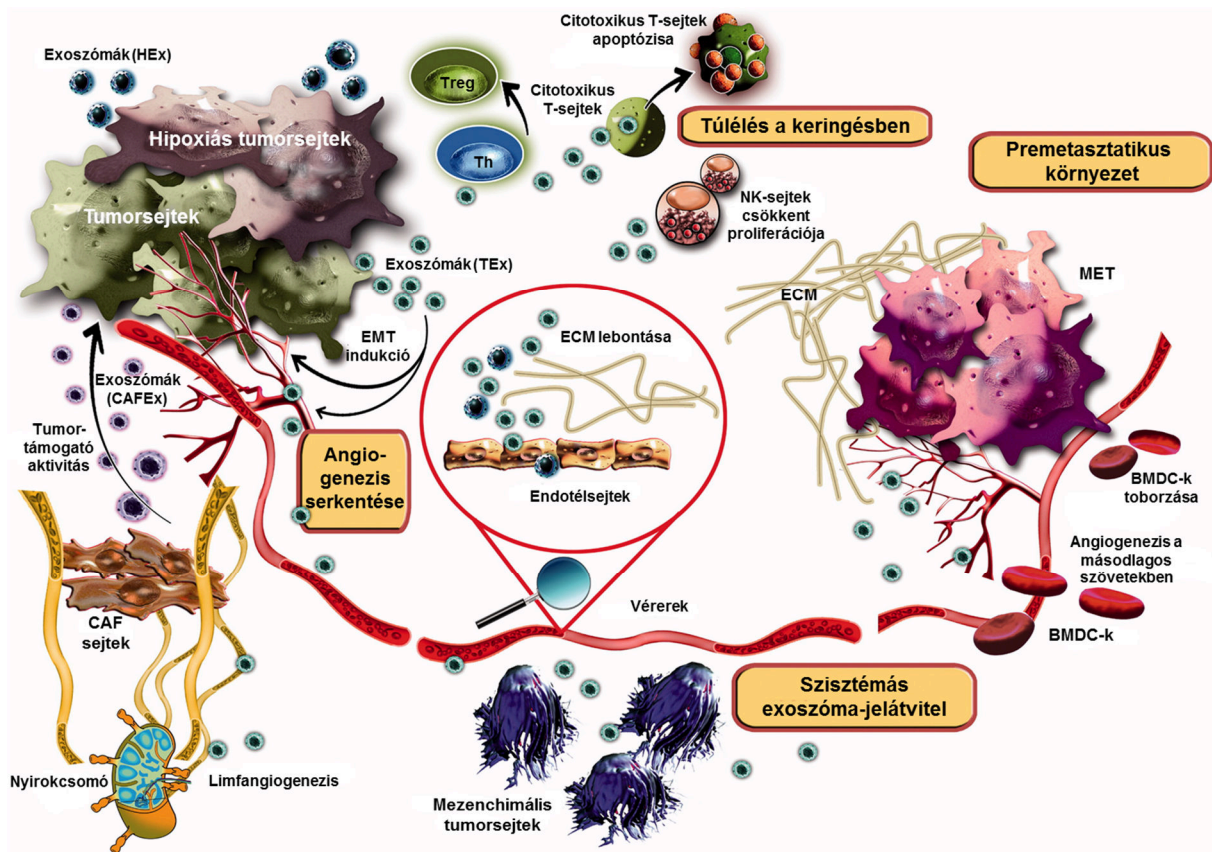
1. Bevezetés

Az extracelluláris vezikulák (EV-k), sejtek által szekretált lipidvezikulák az extracelluláris térben. Három főbb típusuk, a mikrovezikulák, apoptotikus testek, és exoszómák, melyeket a termelés és kibocsátás módja, valamint méretük, tartalmuk és funkciójuk alapján különítünk el. A legkisebb méretű EV-k, az endoszómális útvonalon keletkező exoszómák (30-150 nm). A gyakorlatban, a vezikula preparátumokat EV-k keveréke alkotja, ráadásul az egyes vezikula-típusokra jellemző markerekről sem alakult még ki konszenzus. Ezért, egy útmutató, az Alapvető tudnivalók az extracelluláris vezikulák tanulmányozásához 2018 (Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 – MISEV2018) operatív terminusok használatát javasolja. Jelen tanulmányban a vezikulákat méretük alapján (<220 nm) izoláltuk, ezért a továbbiakban a kis EV-k (small EV – sEV) kifejezéssel hivatkozom rájuk, annak ellenére, hogy karakterizálásuk során exoszómális jellemzőket mutattak.

Az exoszómák kritikus szerepet töltenek be mind a szomszédos, mind a távoli sejtek kommunikációjában. Lipideket, fehérjéket és különféle genetikai anyagokat, például DNS-t, mRNS-t, és nem kódoló RNS-eket is közvetítenek a sejtek közt. Az exoszómális lipid kettősrétegen belül, a citokinek, miRNS-ek és más jelátvivő molekulák védelmet élveznek az extracelluláris enzimekkel szemben, amely lehetővé teszi, hogy azok funkcionálisan aktív formában juthassanak el a célsejtekig. Ily módon az exoszómák számtalan fiziológiai és patológiás folyamatban vesznek részt, beleértve a daganatos betegségeket is. Ezért az exoszómák közvetítette molekulák és jelátviteli útvonalak, mint a személyre szabott gyógyászat potenciális diagnosztikai és terápiás célpontjai, az érdeklődés középpontjába kerültek.

A közelmúltban számos közlemény számolt be az exoszómák tumorgenezisben, tumornövekedésben, metasztázisképzésben és immunmodulációban betöltött szerepéről, mely lokálisan és a távoli malignus helyeken is érvényesül. Az exoszómák nemcsak a tumoros mikrokörnyezet parakrin kommunikációjának fontos szereplői, de szisztémás hatásai révén részesei a másodlagos tumorhelyek előkészítésének is (1. ábra). Az exoszómák molekuláris és genetikai „üzenetek” közvetítése révén képesek a recipiens sejtek fenotípusának és funkcionális jellemzőinek módosítására.

Amint a szolid tumorok érhálózata már nem képes kielégíteni a gyorsan növekvő tumor oxigénigényét, hipoxiás és nekrotikus területek alakulnak ki, amelyek speciális kémiai mikrokörnyezettel rendelkeznek, alacsony az oxigén- és tápanyag-koncentrációjuk és a pH-juk. Ezen körülmények fokozzák a rosszindulatú sejtek exoszóma termelését, ezért a mikrokörnyezeti stresszhatások alatt kibocsátott exoszómák tartalmának vizsgálata kiegészítheti a tumorprogresszióban betöltött szerepükről szerzett ismereteinket és hozzájárulhat hatékonyabb sEV-alapú prognosztikus és terápiás stratégiák kifejlesztéséhez is.



1. ábra A tumoreredetű exoszómák módosítják a tumoros mikrokörnyezetet és megágyaznak a távoli szövetekben a metasztázisok kialakulásának. Fordított ábra Gulei *et al.* (2018) alapján.

2. Célkitűzések

Jelen tanulmányban az 5-8F humán nazofaringeális karcinóma- (nasopharyngeal carcinoma – NPC) és a B16F1 egér melanómasejtek vezikuláris információ-átvitelének összehasonlítását tűztük ki célul különböző mikrokörnyezeti tényezők mellett. Ennek megfelelően a tumoreredetű sEV-k átfogó kvantitatív és kvalitatív összehasonlítását végeztük el a következő célkitűzések alapján:

1. az sEV-termelés összehasonlítása különböző mikrokörnyezeti tényezők mellett,
2. a különböző mikrokörnyezeti tényezők mellett termelt sEV-k molekuláris mintázatának jellemzése,
3. a doxorubicin és az Ag-TiO₂ nanopartikulumok sEV-k általi potenciális átvitelének vizsgálata,
4. az sEV-k funkcionális aktivitásának modellezése a recipiens sejtekben *in silico* módszerekkel,
5. a különböző mikrokörnyezeti tényezők mellett termelt sEV-k funkcionális jellemzőinek összehasonlítása,
6. a különféle tumorsejtek sEV-k általi kommunikációjára jellemző adaptív hajlam összehasonlítása,
7. a melanómaeredetű sEV-k kiváltotta válaszmintázatok összehasonlítása a recipiens sejtekben,
8. a melanómaeredetű sEV-k indukálta migrációs válaszok összehasonlítása különféle recipiens sejtekben,
9. az *in silico* analízisek hasznosságának meghatározása az sEV kutatásban.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Sejtkultúrák

Az 5-8F humán NPC-sejtvonalat Ji Ming Wang (NCI Frederick, MD, USA) biztosította, melyet 10% FBS (Euroclone)-, 1% MEM nem esszenciális aminosav-, 1% MEM vitamin oldat- és 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B (P/S/A) oldat-tartalmú DMEM médiumban tenyésztettünk (Lonza). A B16F1 (ECACC 92101203) egér melanóma-sejtvonal az ECACC sejtbankból származik, tápfolyadék 10% FBS-, 2 mM L-glutamin és 1% P/S/A-tartalmú DMEM. Az sEV termeltetéshez mindig vezikula-mentesített FBS-t használtunk.

A primér egér mezenchimális őssejteket (mesenchymal stem cells – MSC) 6-8 hetes hím C57BL/6 egerek (Charles River Laboratories) zsírszövetéből izoláltuk, és a MesenCult Expansion Kit (Stemcell Technologies) segítségével tenyésztettük. Az egér embrionális fibroblaszt sejtek (MEFs; ATCC SCRC-1040) és a bEnd.3 egér endotél-sejtvonal (ATCC CRL-2299) az ATCC sejtbankból származik és 15%, illetve 10% FBS-, és 1% P/S/A-tartalmú DMEM-ben tenyésztettük. A kultúrákat 37 °C-os inkubátorban tartottuk 5% CO₂ mellett.

3.2 Ag-TiO₂ fotokatalizátor részecskék

A szintézishez, a kereskedelmi forgalomban kapható TiO₂-t (Degussa P25, Evonik) használtuk, mint standard fotokatalizátort. A fotokatalízis hatékonyságának növelése érdekében plazmonikus Ag nanorészecskéket kötöttünk a TiO₂ felületére. Majd DPBS-ben 10 mg/ml-es Ag-TiO₂ diszperziót készítettünk, melyet használat előtt 30 percig szonikáltunk.

3.3 Stressz kondíciók

Az 5-8F sejtkultúrákat 70% konfluencia elérésekor háromféleképpen kezeltük oly módon, hogy a médiumot lecseréltük friss médiumra, 0,6 µM doxorubicin-tartalmú friss médiumra, vagy fényindukált 2,5 µg/ml Ag-TiO₂-tartalmú friss médiumra. Az Ag-TiO₂ megvilágítása során reaktív oxigéngyökök (reactive oxygen species – ROS) keletkeznek.

A B16F1 sejtek esetében 2 további stresszkondíciót is alkalmaztunk. Az egyik ilyen sejtcsoportot hőstressznek tettük ki, azáltal, hogy 24 h-ként (összesen 3×) 2 h-ra 42 °C-os termosztátba tettük. A másik sejtcsoport az Ag-TiO₂-kezelés kontrolljaként, magának a megvilágításnak és a ROS-indukálta oxidatív stressz hatásának az elkülönítésére szolgált.

A kezelési protokollok előzetes optimalizáláson és irodalmi adatokon alapultak. Sejtcsoportonként 72 h inkubáció után 6 kultúráról gyűjtöttünk össze felülűszókat az sEV-izoláláshoz.

3.4 Pásztázó elektronmikroszkópia (scanning electron microscopy – SEM)

A B16F1 sejteket poli-L-lizin bevonatú 5 mm-es fedőlemezekre a fentiek szerint kezeltünk. 24 h után a sejteket DPBS-sel mostuk és 2,5% glutáraldehid- és 0,05 M kakodilát-tartalmú pufferben fixáltuk egy éjszakán át. DPBS-es mosás után a sejteket etanol-sorral dehidratáltuk, majd egy kritikus pont szárítóban (Quorum, K850) kiszárítottuk és 15 nm-es aranyréteggel vontuk be (Quorum, Q150), végül egy téremissziós pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (Jeol, JSM-7100F/LV). Képeket 1.500× és 20.000× nagyításban készítettünk.

3.5 sEV-izolálás és karakterizálás

A felülszókát elsőként 4 °C-on centrifugáltuk: 780 g-vel 5 percig és 3.900 g-vel 15 percig, majd 0,22 µm pórusméretű membránon szűrtük a sejteket, törmelékek és nagyobb vezikulák eltávolítása végett. Ezután az sEV-eket ultracentrifugálással ülepítettük (150.000 g, 60 min, 4 °C), a pelletet 2× mostuk DPBS-sel, majd DPBS-ben szuszpendáltuk fel. A B16F1 sEV-izolátumok fehérjekoncentrációját Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Scientific) segítségével mértük, majd atomerő-mikroszkópiával (atomic force microscopy – AFM), dinamikus fényszórással (dynamic light scattering – DLS) és Western blottal jellemeztük.

3.5.1 Az sEV-csoportok kvantitatív összehasonlítása

A termelt sEV-k számát nanorészecskék mozgását követő módszerrel (nanoparticle tracking analysis – NTA) vizsgáltuk egy NanoSight NS500 készülékkel (Malvern Panalytical).

3.6 Az sEV-k tartalmának vizsgálata a különféle sEV-csoportokban

Az sEV-k miRNS-készletét mindkét, proteomját csak a B16F1 sejtvonal esetén vizsgáltuk.

3.6.1 Az sEV-k miRNS-tartalmának analízise

Az sEV-pelletek miRNS-tartalmát a NucleoSpin miRNA isolation kit (Macherey-Nagel) segítségével izoláltuk a gyártó instrukcióit követve. A szekvenálást egy SOLiD 5500xl készülékkel végeztük a gyártó protokollja szerint. A nyers adatok bioinformatikai analízise a CLC Genomics Workbench 8.0.2 (Qiagen Bioinformatics) verziójával történt, ahol a miRBase 21. kiadásának annotált *Mus musculus* miRNS szekvenciáit használtuk referenciaként, és a 10, vagy annál több találattal rendelkező miRNS-eket fogadtuk el.

3.6.2 B16F1-eredetű sEV-k tömegspektrometriai analízise

A tömegspektrometriához (liquid chromatography-tandem mass spectrometry – LC-MS/MS) a vezikuláris fehérjéket (25 µg/minta) SDS-PAGE segítségével választottuk el, majd

Coomassie-kékkel festettük. A gél mintánként 12 egyenlő részre vágtuk fel, a fehérjéket a gélben emésztettük, majd a peptid-kivonatokat egy nanoHPLC (nanoAcquity, Waters) rendszerhez kapcsolt LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific) tömegspektrométerrel analizáltuk. A keresésre alkalmas listát a Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) segítségével állítottuk fel, majd az adatbázis lekereséshez saját Protein Prospector 5.14.1 keresőnként és az Uniprot adatbázis *Mus musculus* és *Bos taurus* szekvenciáit használtuk. A találatok közül, a legalább 3 peptiddel azonosított fehérjéket fogadtuk el, de kizártuk a marhában és egérben azonos szekvenciájú peptideket. Az FDR értékek mindig 1% alatt voltak.

3.7 Az sEV-csoportok funkcionális összehasonlítása

Az 5-8F miRNS, és a B16F1 miRNS- és fehérjeadatokat bioinformatikai analízisnek vetettük alá, majd a B16F1 esetében *in vitro* tesztekkel igazoltuk a kapott *in silico* eredményeket.

3.7.1 Az sEV molekulák *in silico* analízise

A normalizált miRNS- és fehérje-adatok elemzését az Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen Bioinformatics) szoftverrel végeztük. Az ‘Összehasonlító Analízis’ funkcióval olyan ‘Biofunkciókat’ kerestünk, amelyek relevánsak lehetnek NPC, illetve melanóma esetében és p-értékük ≤ 0.00001 . Majd néhány ‘Biofunkció’ esetében megvizsgáltuk az sEV-k szabályozó szerepét is. A ‘Növesztés’ eszközzel minden ‘Biofunkció’-ra és minden sEV-csoportra azonosítottuk a vezikuláris kölcsönható molekulákat. Majd a ‘Molekula Aktivitási Prediktor (MAP)’ révén jellemeztük a különböző sEV-csoportok aktiváló, illetve gátló hatását az egyes ‘Biofunkciók’-ra. Az ábrákat az IPA-val készítettük, majd Excel diagramokkal egészítettük ki.

3.7.2 A B16F1 sEV-csoportok funkcionális összehasonlítása *in vitro* tesztekkel

A recipiens sejteket naponta 200 µg/ml-es sEV-szuszenziókkal, vagy negatív kontrollként DPBS-tartalmú médiummal kezeltük 24, 48, vagy 72 h-án át.

3.7.2.1 MSC-k Ki-67-expressziójának vizsgálata

A 24, illetve 72 h-s sEV-kezelt MSC-ket 4% paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk (10 min, szobahő – room temperature/RT). Majd a sejteket 0.1% Triton X-100-tartalmú pufferben permeabilizáltuk és az aspecifikus antitest kötődés elkerülése végett 5%-os BSA oldattal inkubáltuk. A Ki-67 jelölésére az eFluor 615 festékkal konjugált anti-egér/patkány Ki-67 monoklonális antitestet alkalmaztuk (1:400, eBioScience) 1,2% BSA oldatban egy éjszakán át, 4 °C-on. A sejtmagokat 200 ng/ml DAPI-val festettük (5 min, RT). A sejteket minden lépés

közt DPBS-sel mostuk (3×5 min). A fluoreszcens képeket egy Operetta nagy áteresztő képességű képképző rendszerrel (PerkinElmer) készítettük és az SCT Analyzer 1.0 szoftverrel elemeztük a gépi tanulás módszere révén. A kísérletet $4 \times$ ismételtük.

3.7.2.2 Sejtszámolás

Az sEV-kezelt MSC-ket 384-lyukú plate-ken fixáltuk 4% PFA-val (10 min, RT), majd $1 \mu\text{g/ml}$ DAPI-val festettük (15 min, RT). Egy TCS SP8 mikroszkóp (Leica) segítségével a lyukak teljes területéről fluoreszcens képeket készítettünk, majd azokat az SCT Analyzer 1.0 gépi tanulási szoftver segítségével elemeztük. A kísérletet $3 \times$ ismételtük.

3.7.2.3 Sejtciklus analízis

Az sEV-kezelt B16F1 sejtek sejtciklus-dinamikájában bekövetkező változásokat az ún. Cell-Clock sejtciklus esszével vizsgáltuk (Biocolor) a gyártó protokollja szerint 4 ismétlésben.

3.7.2.4 Sebgyógyulási esszé

Az sEV-kezelt B16F1 és bEnd.3 sejtek migrációját sebzési esszével vizsgáltuk 8, illetve 4 ismétlés-számmal. A közel konfluens sejt kultúrákon $200 \mu\text{l}$ -es pipettahegyekkel hosszanti sebet ejtettünk, majd $3 \times$ mostuk médiummal és sEV- vagy DPBS-tartalmú médiummal kezeltük. A sebzáródás során egy Axiovert S100 mikroszkópra (Zeiss) szerelt Nikon D5000 fényképezőgéppel képeket készítettünk az ImageJ szoftverrel való analízishez.

3.7.2.5 A mikroszövet-képzés vizsgálata

MSC/MEF és B16F1 sejtek 1:1 arányú keverékét 96-lyukú GravityPLUS függőcsepp lemezekre (InSphero) ültettük sEV- vagy DPBS-tartalmú médiumban (5.000 sejt/ $40 \mu\text{l}$ /lyuk). A mikroszövetek kialakulását 72 h-n át követtük, majd azokat egy Axiovert S100 mikroszkópra (Zeiss) szerelt Nikon D5000 fényképezőgéppel fotóztuk. A mikroszövetek morfológiai paramétereit az AnaSP szoftverrel számszerűsítettük. A kísérletet $3 \times$ ismételtük.

3.8 Statisztikai analízis

A statisztikai analíziseket Welch-próbával és Tukey HSD utótesztetével végeztük egy Microsoft Excel kiegészítővel (Real Statistics Resource Pack). A diagramokat a GraphPad Prism 5.03 segítségével készítettük a számtani közép+szórás értékek ábrázolásával. A csillagok száma az ábrákon a statisztikai szignifikancia értékének minimumát jelzi: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

4. Eredmények

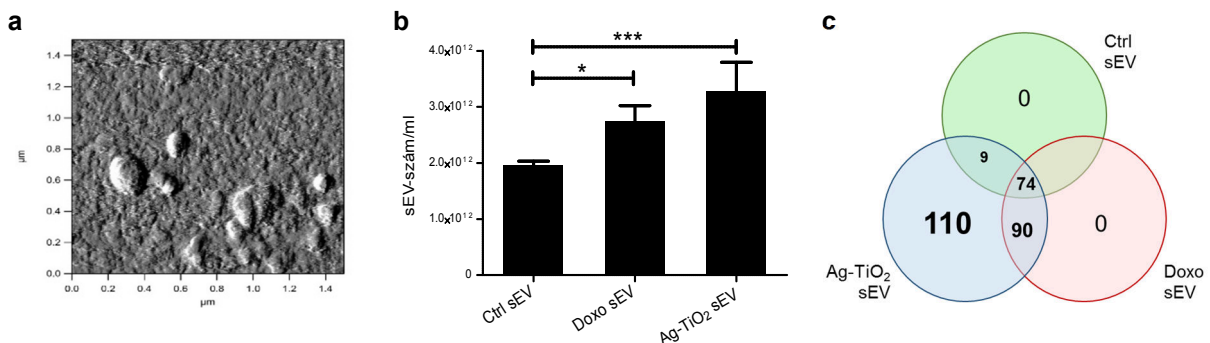
Célunk, a tumorsejtek sEV-mediált kommunikációjában, különböző mikrokörnyezeti tényezők által kiváltott, adaptív válaszok tanulmányozása volt. Ezért az 5-8F humán NPC- és a B16F1 egér melanómaeredetű sEV-k stresszindukálta változásait vizsgáltuk.

4.1 Az NPC-eredetű sEV-k vizsgálata

Elsőként a kezeletlen 5-8F-eredetű sEV-ket differenciálszűrővel és ultracentrifugálással izoláltuk, és AFM-mel vizsgáltuk. Majd az 5-8F sejt kultúrákat 0,6 μM doxorubicin (Doxo) és 2,5 $\mu\text{g/ml}$ fényindukált Ag-TiO₂ (Ag-TiO₂) kezelések révén, citosztatikus és oxidatív stressznek tettük ki. Kontrollként (Ctrl) kezeletlen kultúrákat használtunk. 72 h elteltével a kultúrák felülúszóiból izoláltuk az sEV-ket, melyeket NTA segítségével kvantifikáltunk és miRNS-készletük meghatározása érdekében SOLiD szekvenálásnak vetettük alá. A kapott miRNS-adatokat *in silico* elemeztük az IPA szoftverrel, hogy feltárjuk az sEV-csoportok funkcionális eltéréseit.

4.1.1 Különböző mikrokörnyezeti körülmények mellett termelt NPC-eredetű sEV-k leíró statisztikai jellemzői

Miután az AFM vizsgálatok igazolták a vezikulák exoszómális alakját és méretét (2a ábra), az sEV-számokat NanoSight analízis révén hasonlítottuk össze a különböző csoportokban. A kontroll kultúrákhoz képest szignifikánsan megnövekedett az 5-8F sejtek sEV-termelése citosztatikus ($p=0,0146$) és oxidatív stressz ($p=0,0006$) esetén is (2b ábra).



2. ábra. Az 5-8F-eredetű sEV-k jellemzése. (a) Intakt sEV-k nagy felbontású AFM képe. (b) Az NTA módszerrel meghatározott csoportonkénti vezikulaszámok ($n=4$); az oszlopok számtani közép+szórás értékeket ábrázolnak; * $p<0,05$; *** $p<0,001$. (c) A három sEV-csoport miRNomjának összehasonlítása.

A miRNS-diverzitást illetően szintén jelentős növekedést tapasztaltunk mindkét stressztípus esetén. Összesen 283 miRNS-t azonosítottunk a SOLiD szekvenálás során. A miRNS-ek 26,15%-a (283-ból 74) mindhárom sEV-csoportban előfordult, 31,80% (283-ból 90) volt detektálható mindkét stressz esetén (de a Ctrl sEV-csoportban nem), és 38,87% (283-ból 110)

kizárólag csak az Ag-TiO₂ sEV-kben volt detektálható (2c ábra). Ctrl és Doxo sEV-specifikus miRNS-eket nem találtunk. Tehát, citosztatikus stressz esetén 2,22x, oxidatív stressz esetén pedig 3,82x többféle miRNS-t tudtunk azonosítani.

4.1.2 Az sEV-csoportok funkcionális különbségeinek *in silico* analízise

A molekulák széles választékát tartalmazó exoszómális szállítmány, komplex információs csomagként, számos biológiai folyamatban szerepet játszhat a recipiens sejtekben. Jelen vizsgálatokban, ezen biológiai folyamatok azonosítását tűztük ki célul. Azért, hogy miRNS-adatainkat biológiai kontextusba helyezhessük, az IPA használatával bioinformatikai analízist végeztünk. E szoftver számítógépes algoritmusokra épül, melyek az 'Ingenuity Tudásbázist' kiaknázva elemzik a molekulák közti funkcionális kapcsolatokat. Ezen *in silico* analízisekhez 'kísérletesen bizonyított' konfidencia szintet választottunk, amely lehetővé teszi a szakirodalmi adatokon alapuló analízist, de kizárja a bizonyítatlan predikciókat. A dolgozatban szereplő, aposztrófok közti kifejezések 'IPA-specifikus terminusok'.

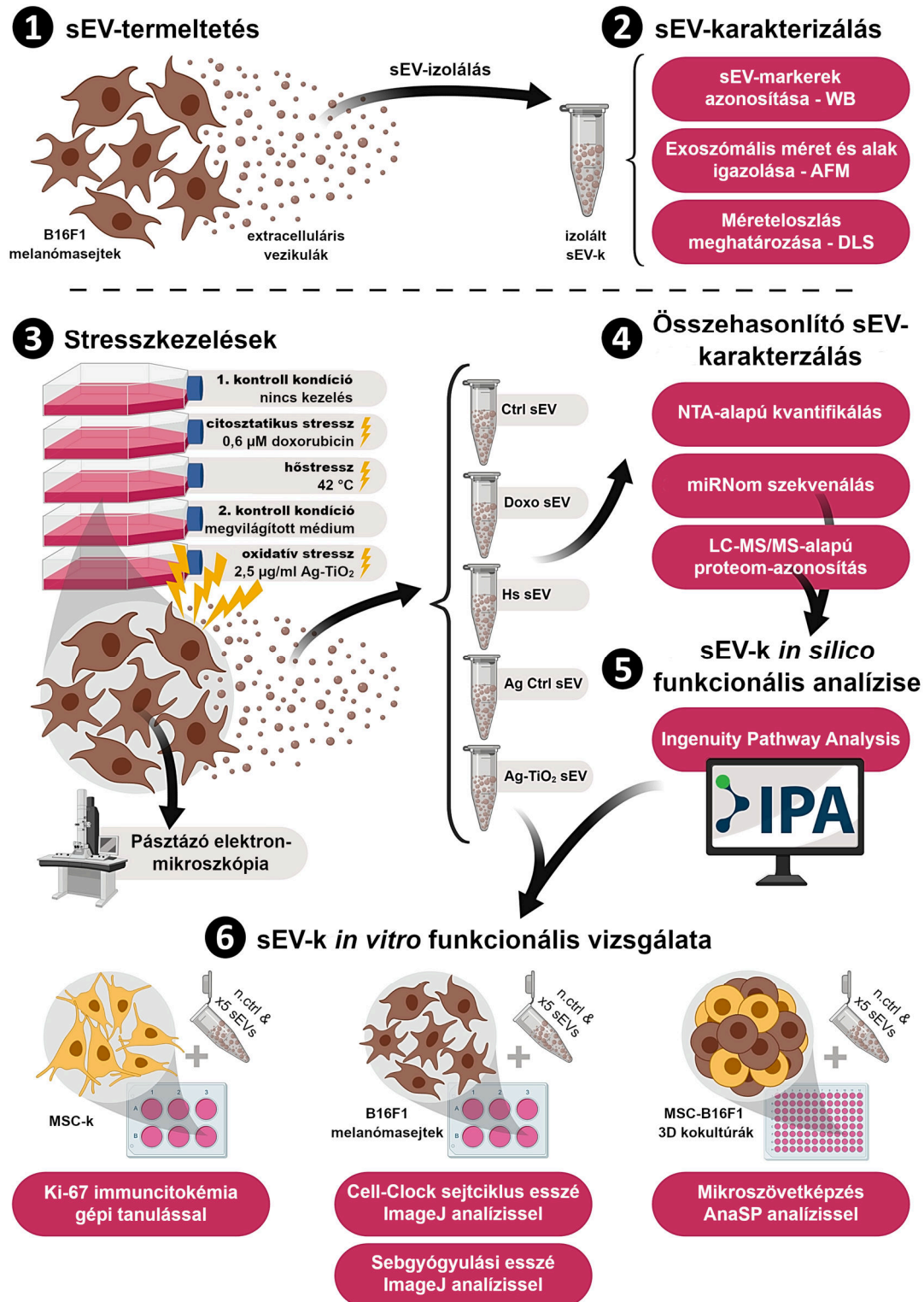
Az 'Összehasonlító Analízis' során számos NPC-vel kapcsolatos 'Biofunkciót' azonosítottuk, melyekre valamely sEV-csoport szignifikáns hatást gyakorolhat ($p \leq 0,00001$). Ezen analízisek szerint az sEV-k nemcsak intracelluláris és celluláris, hanem szisztémás és immunológiai folyamatokban is részt vehetnek.

Az IPA 'Növesztés' eszköze lehetővé tette válogatott 'Biofunkciók'-kal kölcsönható vezikuláris molekulák azonosítását. Majd az IPA 'MAP' funkciójával prediktálni tudtuk, hogy az sEV-csoportok összességében milyen szabályozó hatást (aktivációt, vagy gátlást) fejthetnek ki a vizsgált 'Biofunkciókon', ahol számos különbséget találtunk az sEV-csoportok közt. Mindez az sEV-k kibocsátási körülményeinek jelentőségéről tanúskodik.

Általánosan, a Ctrl sEV-k tumortámogató hatásokat mutattak: az IPA predikciók szerint olyan 'Biofunkciókat' aktiválhatnak, mint a tumorsejtek proliferációja, életképessége, migrációja, epiteliális-mezenchimális tranzíciója, miközben gátolhatják a tumorsejtek szeneszcenciáját és apoptózisát. Ezzel szemben a Doxo és Ag-TiO₂ sEV-k hatása gyengébb volt, vagy akár az ellentétjére fordult a vizsgált 'Biofunkciókon'. Például, az IPA az életképességre Doxo sEV-k esetén alacsonyabb konfidenciájú aktiváló hatást, Ag-TiO₂ sEV-k esetén pedig gátlást prediktált. A migráció szabályozása mindkét sEV-hatásra gátlóra változott. Ez arra utal, hogy a stresszhatásra termelt NPC sEV-k miRNomja elveszítheti tumortámogató sajátosságait.

4.2 A melanómaeredetű sEV-k vizsgálata

A kutatás második felében stresszindukált B16F1 melanómasejtek sEV-mediált intercelluláris kommunikációjának vizsgálatát tűztük ki célul.



3. ábra. Melanóma sEV-k vizsgálatának kísérleti elrendezése; n.ctrl: negatív kontroll, x5 sEVs: 5-féle sEV-kezelés.

Az izolált B16F1 sEV-k exoszómális sajátosságainak igazolását követően, azok citosztatikus, hő-, és oxidatív stressz indukálta változásait vizsgáltuk. A melanómasejteket öt különböző módon kezeltük: a kontroll (Ctrl) kultúrák tiszta sejt kultúra médiumot kaptak, a citosztatikus stresszt (Doxo) 0,6 μ M doxorubicinnel váltottuk ki, a hőstresszelt kultúrákat (Hs) 3×2 h-ra 42 °C-os inkubátorba helyeztük, az oxidatív stresszt (Ag-TiO₂) 2,5 μ g/ml fényindukált Ag-TiO₂-kezeléssel idéztük elő, utóbbi kontrolljaként pedig megvilágított médiummal kezelt kultúrákat (Ag Ctrl) használtunk. Majd az öt sejt kultúra-csoport sEV-izolátumait NTA, SOLiD szekvenálás és LC-MS/MS módszerekkel vizsgáltuk, a kibocsátott vezikulák számának, miRNomjának és proteomjának jellemzése végett. Funkcionális különbségeiket elsőként a kapott miRNS- és fehérje adatok alapján *in silico* prediktáltuk, az IPA segítségével, majd *in vitro* kísérletekben igazoltuk a recipiens sejtek tumorhoz köthető sejt funkcióinak, úgymint Ki-67-expressziójának, sejt ciklus-dinamikájának, migrációs kapacitásának és mikroszövet-képzésének vizsgálatával (3. ábra).

4.2.1 A különböző mikro környezeti tényezők mellett kibocsátott melanóma sEV-k leíró statisztikai jellemzői

4.2.1.1 Szuboptimális körülmények mellett a melanómasejtek vezikulatermelése megnő

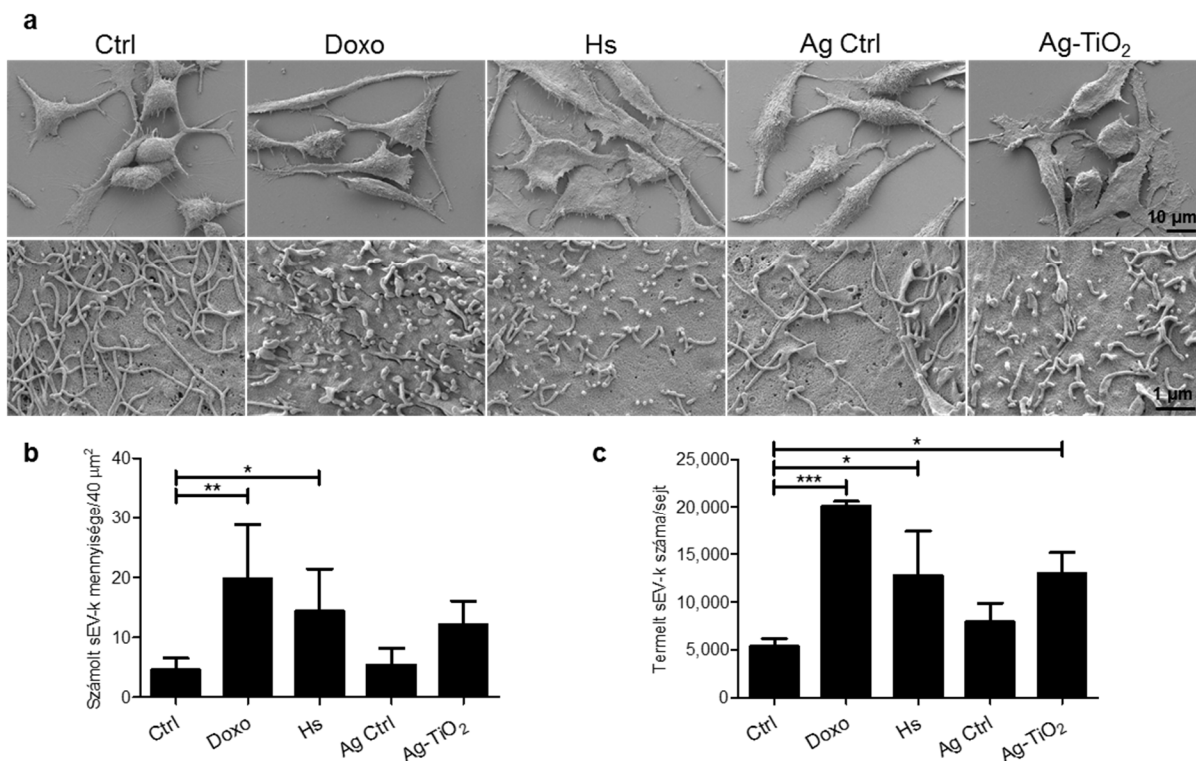
A B16F1 sejtek mindhárom stressz hatás (Doxo, Hs and Ag-TiO₂) esetén látványos morfológiai változásokat mutattak a SEM képeken 24 h-val a kezeléseket követően (4a ábra). Ráadásul 20.000 \times -es nagyításban a sejt felszíni struktúrák, többek közt az exoszómális méretű vezikulák is láthatóvá váltak, melyek száma szintén magasabb volt, mint a Ctrl sejteken ($p_{\text{Doxo}}=0,00297$; $p_{\text{Hs}}=0,03928$; $p_{\text{Ag-TiO}_2}=\text{n.s.}$; $n=5$; 4a-b ábra).

Az izolált vezikulák számát az NTA-alapú NanoSight analízissel is megmértük. Donorsejtjeink vezikulatermelése mindhárom stressz hatásra szignifikánsan megnövekedett a Ctrl sejtekhez képest ($p_{\text{Doxo}}=0,00021$; $p_{\text{Hs}}=0,03006$; $p_{\text{Ag-TiO}_2}=0,02462$; $n=3$; 4c ábra).

4.2.1.2 A melanóma sEV-k átvihetik a doxorubicint, de az Ag-TiO₂-t nem

Fluoreszcens spektroszkópiát alkalmazva megmértük a Doxo sEV-k doxorubicintartalmát, amely alacsonyabbnak bizonyult az egér melanómasejteken mért medián letális dózishoz (LD50=100 ng/ml). Így az átvitt doxorubicin hatása elhanyagolható a recipiens sejtekben.

Ugyanakkor az Ag-TiO₂ nanopartikulumok sEV-kbe történő becsomagolásának lehetőségét DLS, kemilumineszcens detekció és transzmissziós elektronmikroszkópia révén kizártuk.



4. ábra. A mikrokörnyezeti stresszfaktorok morfológiai változásokat és megnövekedett sEV-termelést váltottak ki a melanómasejteken. (a) A sejtek pásztázó elektronmikroszkópos képei. (b) A sejtfelszíni exoszómális méretű vezikulumok száma az ImageJ értékelések alapján (n=5). (c) A sejtenként termelt vezikulumok száma az NTA mérések szerint (n=3). A diagramok számtani közép+szórás értékeket ábrázolnak; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.2.1.3 A melanóma sEV-k molekuláris mintázata nagymértékben függ a donorsejtekre ható mikrokörnyezeti tényezőktől

A vezikuláris szállítmány mikrokörnyezeti stressz indukálta változásainak jellemzése érdekében az sEV-csoportok miRNS- és fehérjetartalmát SOLiD szekvenálással és LC-MS/MS-sel analizáltuk. A detektált miRNS-ek 35,04%-a (254-ből 89) és az azonosított fehérjék 59,72%-a (216-ből 129) fordult elő minden sEV-csoportban (5. ábra). Azonban az öt sEV-csoport molekuláris mintázata igen eltérő volt, amely az sEV-mediált kommunikációban a vezikulatermelés körülményeinek kritikus jelentőségéről árulkodik.

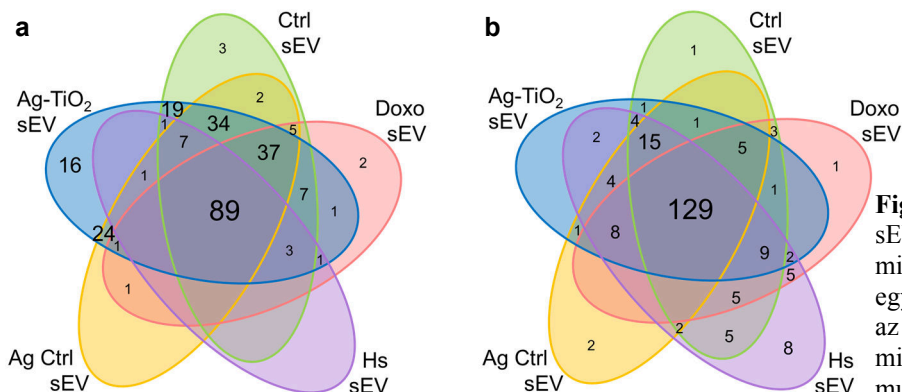


Figure 5. A melanómaeredetű sEV-k molekuláris mintázata minden stressztényező esetén egyedi volt. A Venn-diagramok az öt sEV-csoport (a) miRNomját és (b) proteomját mutatják be.

4.2.2 Az sEV-csoportok funkcionális különbségeinek *in silico* analízise

A melanóma sEV-csoportok által befolyásolt biológiai folyamatok azonosítása végett, miRNS- és fehérjeadatainkat bioinformatikai analízisnek vetettük alá.

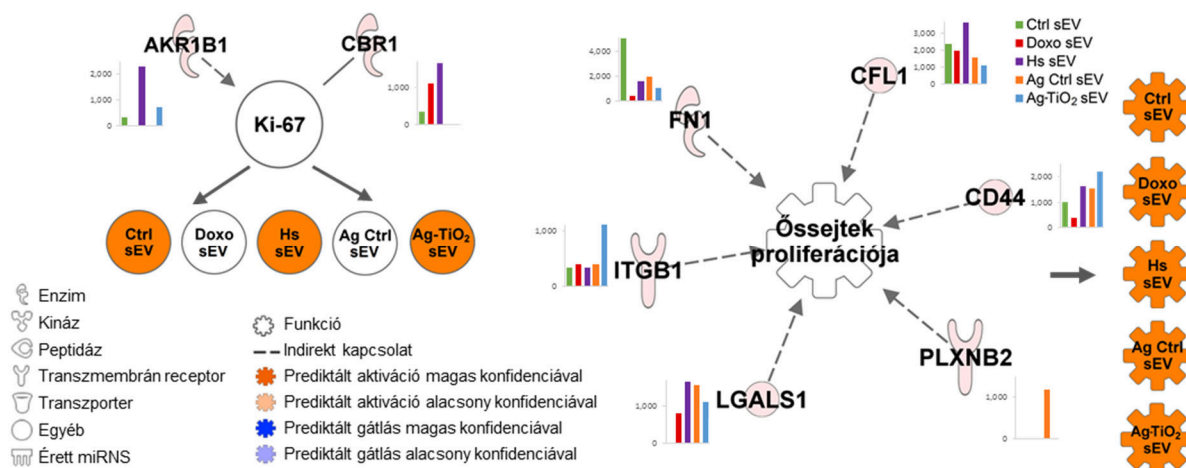
Az IPA-ban végzett ‘Összehasonlító Analízis’ alapján, csakúgy, mint az NPC-n végzett kísérleteinkben, számos melanómához köthető ‘Biofunkciót’ tudunk azonosítani, melyekre az sEV-k szignifikáns hatást gyakorolhatnak ($p \leq 0,00001$). Szintén találtunk intracelluláris funkciókat, mint a ‘Tumorsejtvonalak G1 fázisának megállítása’, sejtszintű folyamatokat, mint a ‘Melanóma-sejtvonalak mozgása’, szisztémás folyamatokat, mint a ‘Sejtek metasztázisa’ és immunológiai funkciókat is, mint a ‘Leukociták aktivációja’.

4.2.3 A tumormátrix sejtek melanóma sEV-k indukálta sejtválaszainak vizsgálata *in silico* predikciókon alapuló *in vitro* kísérletekkel

Az aktiváló és gátló hatások tekintetében, az IPA ‘Növesztés’ és ‘MAP’ funkciói révén sok olyan ‘Biofunkciót’ találtunk, melyeken a különböző sEV-k szabályzó hatása eltérő lehet. Ezért, az *in silico* prediktált, sEV-indukált sejtválaszokat *in vitro* módszerekkel elemeztük.

4.2.3.1 Az Ag-TiO₂ sEV-k fokozzák az MSC-k proliferációját

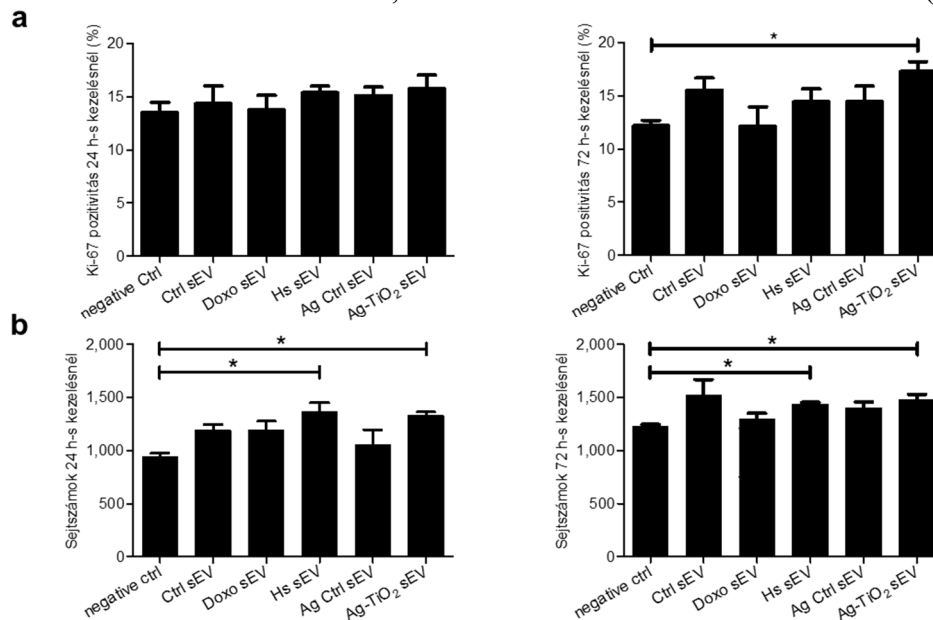
Az *in silico* analízisek a Ki-67-expresszió aktivációját prediktálták a Ctrl, Hs és Ag-TiO₂ sEV-k hatására, és az ‘Össejtek proliferációjának’ aktivációját minden sEV-csoport esetén. Eszerint a vezikulák felvételét követően a recipiens össejtekben háromféle sEV fokozhatja a Ki-67-expressziót és mind az ötféle sEV sejtszétválást válthat ki (6. ábra).



6. ábra. Az sEV molekulák Ki-67-expresszióra és ‘Össejtek proliferációjára’ gyakorolt szabályzó hatásának IPA-predikciója. Az ábrákon minden szabályzó fehérjét feltüntettünk. A hozzájuk tartozó oszlopdiagramok a normalizált expressziós értékeiket mutatják minden sEV-csoportban. Az sEV-csoportok neveivel ellátott színes és szimbólumok a vezikulák prediktált szabályzó hatását jelzik a vizsgált molekulán, illetve ‘Biofunkción’.

Az sEV-k Ki-67-szabályzására vonatkozó predikciók teszteléséhez MSC kultúrákat 200 µg/ml sEV-, vagy negatív kontrollként (negative Ctrl) DPBS-tartalmú médiummal kezeltünk. 24 h, illetve 72 h elteltével a sejtek Ki-67-expresszióját immuncitokémiával vizsgáltuk. A kísérlet kvantitatív értékeléséhez az Operetta nagy áteresztő képességű képalkotó rendszert és egy képanalizáló, gépi tanulással működő szoftvert (SCT Analyzer 1.0) használtunk. Az Ag-TiO₂ sEV-indukált kultúrákban 72 h-s kezelésnél szignifikáns növekedést tapasztaltunk a Ki-67-pozitív sejtek arányában ($p=0,03572$; $n=4$; 7a ábra).

Az MSC-k proliferációját közvetlen sejtszámolás révén vizsgáltuk, melyhez DAPI-festést, képalkotást és gépi tanulást használtunk. A sejtek proliferációja Hs és Ag-TiO₂ sEV-kezelések esetén már 24 h elteltével növekedett, de minden kezelésnek eltérő hatása volt (7b ábra).

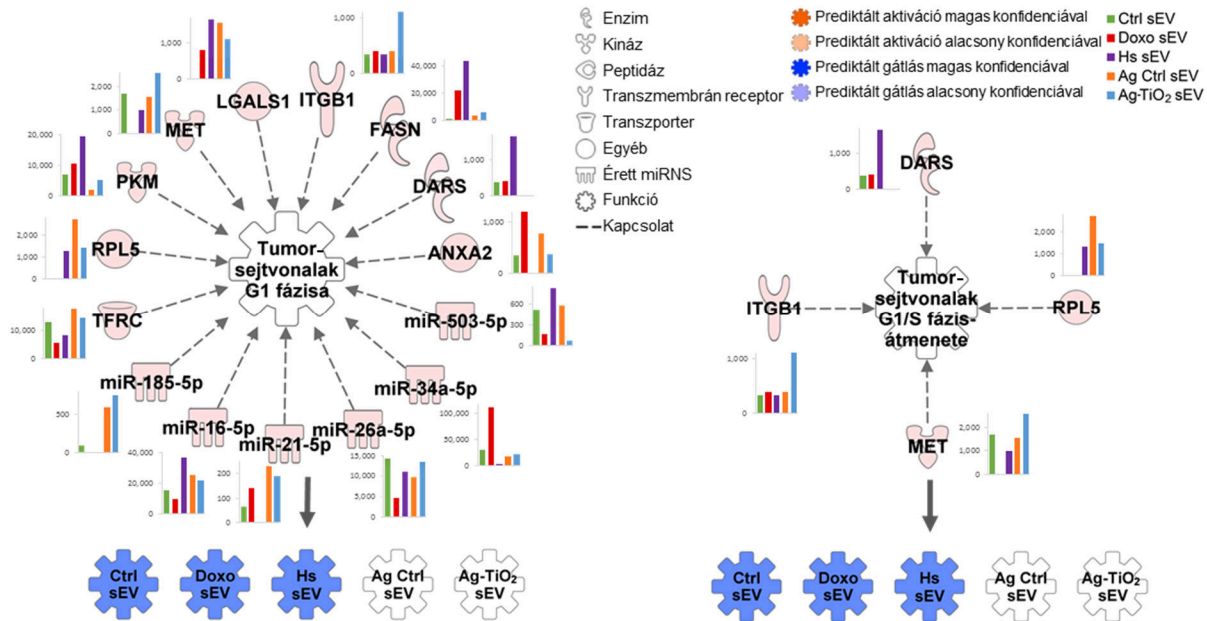


7. ábra. Az sEV-indukált MSC-k osztódási sajátosságai. (a) Ki-67-pozitív sejtek százalékos aránya 24 h (baloldalt) és 72 h (jobbaldalt) elteltével. (b) sEV-indukált kultúrákban kapott sejtszámok 24 h (baloldalt) és 72 h (jobbaldalt) inkubációs időpontokban. A diagramok számtani közép+szórás értékeket ábrázolnak; * $p<0,05$.

In vitro eredményeink arra utalnak, hogy más-más mikrokörnyezeti tényezők befolyása alatt termelt melanóma sEV-k eltérőképpen befolyásolhatják az őssejtek proliferációját, azonban az IPA által prediktált molekuláris interakciókon kívül, más molekulák és más tényezők is részt vehetnek ebben a folyamatban, mint például az sEV-k szállította doxorubicin.

4.2.3.2 A Doxo és Ctrl sEV-k befolyásolják a tumorsejtek sejtciklusát

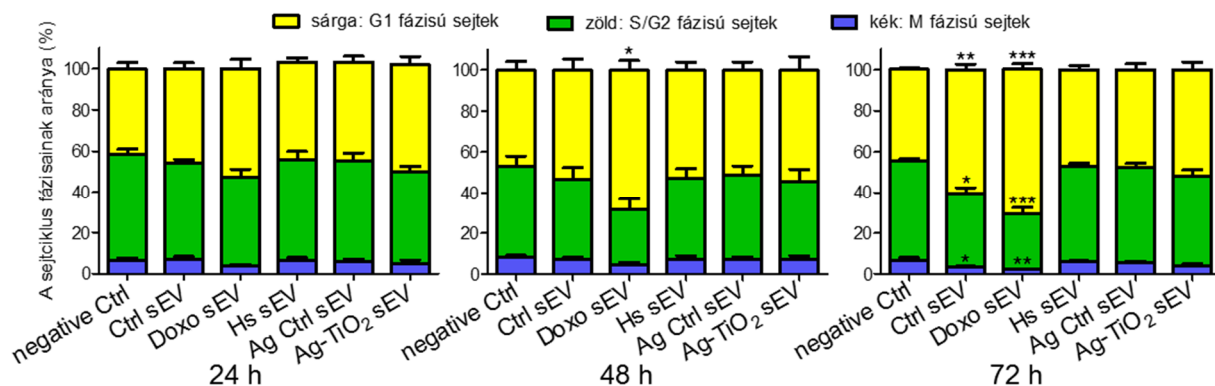
Az IPA-analízisek a 'Tumorsejtvonalak G1 fázisának' és a 'Tumorsejtvonalak G1/S fázisátmenetének' gátlását prediktálták a Ctrl, Doxo és Hs sEV-kre (8. ábra). Vagyis, ezen vezikulák molekula-készlete feltartóztathatja a recipiens tumorsejteket a G1 fázisban.



8. ábra. Az sEV molekulák 'Tumorsejtvonalak G1 fázisára' és 'Tumorsejtvonalak G1/S fázisátmenetére' gyakorolt szabályzó hatásának IPA-predikciója. Az ábrákon minden szabályzó fehérjét és miRNS-t feltüntetünk. A hozzájuk tartozó oszlopdiagramok a normalizált expressziós értékeiket mutatják minden sEV-csoportban. Az sEV-csoportok neveivel ellátott színes szimbólumok a vezikulák prediktált szabályzó hatását jelzik a vizsgált 'Biofunkción'.

Az sEV-k *in silico* prediktált, tumorsejtciklusra gyakorolt hatásainak teszteléséhez az ún. Cell-Clock esszét használtuk, ahol sEV-, vagy negatív kontrollként DPBS-kezelt B16F1 melanóma-sejteket vizsgáltunk 24 h, 48 h és 72 h kezeléseket követően. A teszt egy redox festéken alapul, melynek színe a sejtciklus fázisaitól függően változik (G1: sárga, S/G2: zöld, M: kék).

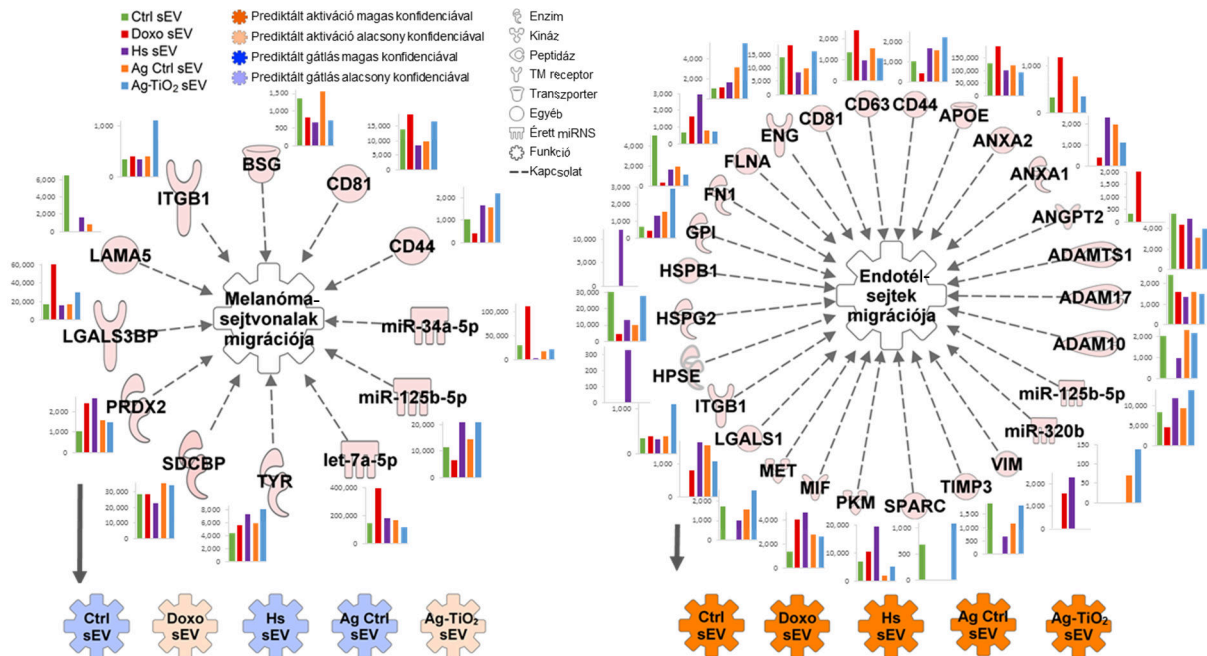
A 9. ábrán látható, hogy a Ctrl és a Doxo sEV-indukciók az idő függvényében szignifikánsan növelték a sárga, azaz a G1 fázisú sejtek arányát ($p_{Ctrl}=0,00346$; $p_{Doxo}=4,28E-06$; $n=4$), amely alátámasztotta az IPA által prediktált sejtciklusgátló hatást a Ctrl és a Doxo sEV-kre (de a Hs sEV-kre nem), ez arra utal, hogy e vezikulák gátolhatják a tumorsejtek proliferációját.




9. ábra. A G1, S/G2 és M fázisú sejtek aránya megváltozik az sEV-kezelt B16F1 kultúrákban. A diagramok számtani közép+szórás értékeket ábrázolnak ($n=4$); * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

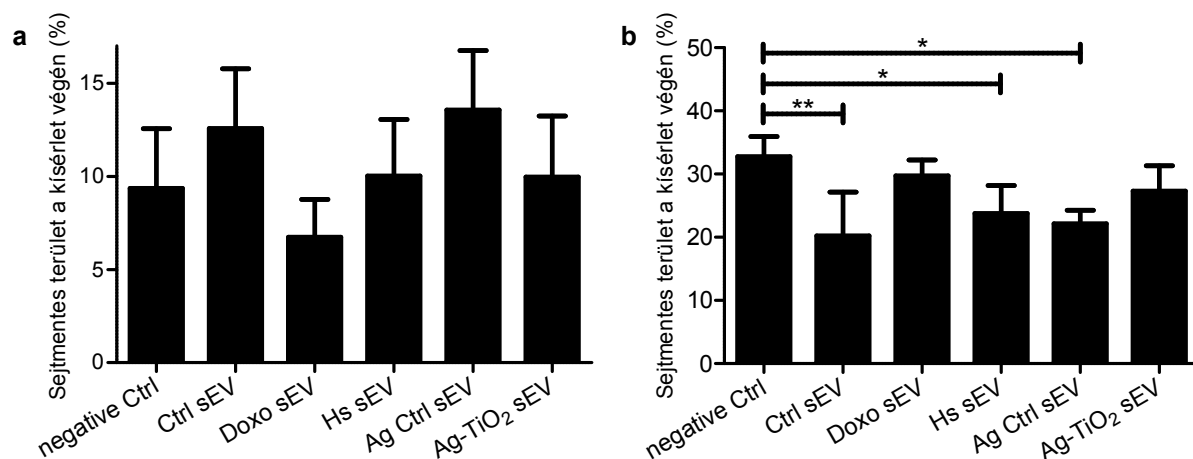
4.2.3.3 Az sEV-mediált sejtmigráció nemcsak a vezikulák típusától, hanem a recipiens sejtől is függ

Az IPA-predikciók szerint az sEV-k számos sejtmozgással kapcsolatos ‘Biofunkciót’ befolyásolhatnak. Ezek közül a ‘Melanóma-sejtvonalak migrációját’ és az ‘Endotélsejtek migrációját’ választottuk *in vitro* tesztelésre, melyek esetében igen változatos sEV-hatásokat láttunk az *in silico* analízisekben: míg a Doxo és Ag-TiO₂ sEV-k elősegíthetik a melanómasejtek migrációját, a maradék három sEV-csoport gátolhatja azt. Ezzel szemben az endotélsejtek migrációját mind az ötféle sEV-csoport serkentheti (10. ábra).



10. ábra. Az sEV molekulák ‘Melanóma-sejtvonalak migrációjára’ és ‘Endotélsejtek migrációjára’ gyakorolt szabályozó hatásának IPA-predikciója. Az ábrákon minden szabályzó molekulát feltüntetünk. A hozzájuk tartozó oszlopdiagramok a normalizált expressziós értékeiket mutatják minden sEV-csoportban. Az sEV-csoportok neveivel ellátott színes  szimbólumok a vezikulák prediktált szabályzó hatását jelzik a vizsgált ‘Biofunkción’.

Az *in silico* prediktált sEV-hatásokat sebgyógyulási esszében B16F1 melanóma- és bEnd.3 endotélsejteken vizsgáltuk, ahol a predikciókhoz hasonló tendenciát figyeltünk meg. A melanómasejtek migrációja a Ctrl és az Ag Ctrl sEV-k jelenlétében enyhén csökkent a negatív Ctrl sejtekhez képest. A Doxo sEV-k viszont felgyorsult sebzáródást váltottak ki (n=8), míg a Hs és Ag-TiO₂ sEV-k nem befolyásolták a tumorsejt-migrációt (11a ábra). Ez azt jelenti, hogy citosztatikus stresszhatás alatt az sEV-k olyan üzeneteket közvetíthetnek a szomszédos tumorsejteknek, amelyek fokozzák azok migrációját.



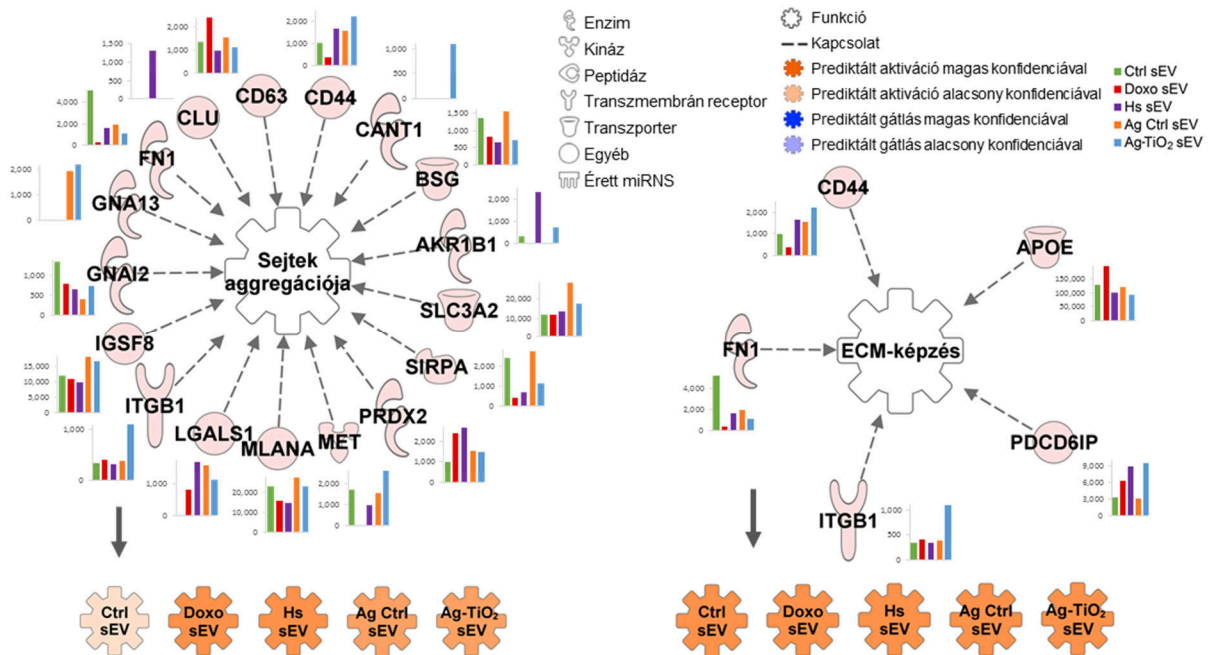
11. ábra. Az sEV-indukált (a) B16F1 és (b) bEnd.3 sejtkultúrák migrációs kapacitása eltérő tendenciákat mutat. A diagramok a sebgyógyulási esszé eredményeit mutatják, melyet az ImageJ sebgyógyulási kiegészítőjével értékeltünk. Az oszlopok számtani közép+szórás értékeket ábrázolnak ($n_{B16F1}=8$, $n_{bEnd.3}=4$); * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Az endotélsejtek migrációját a Ctrl sEV-k fokozták a legnagyobb mértékben, amely arra utal, hogy a normál körülmények mellett kibocsátott vezikulák elősegíthetik az angiogenezis folyamatát, de bizonyos stressztényezők mérsékelhetik ezt az sEV-hatást (11b ábra).

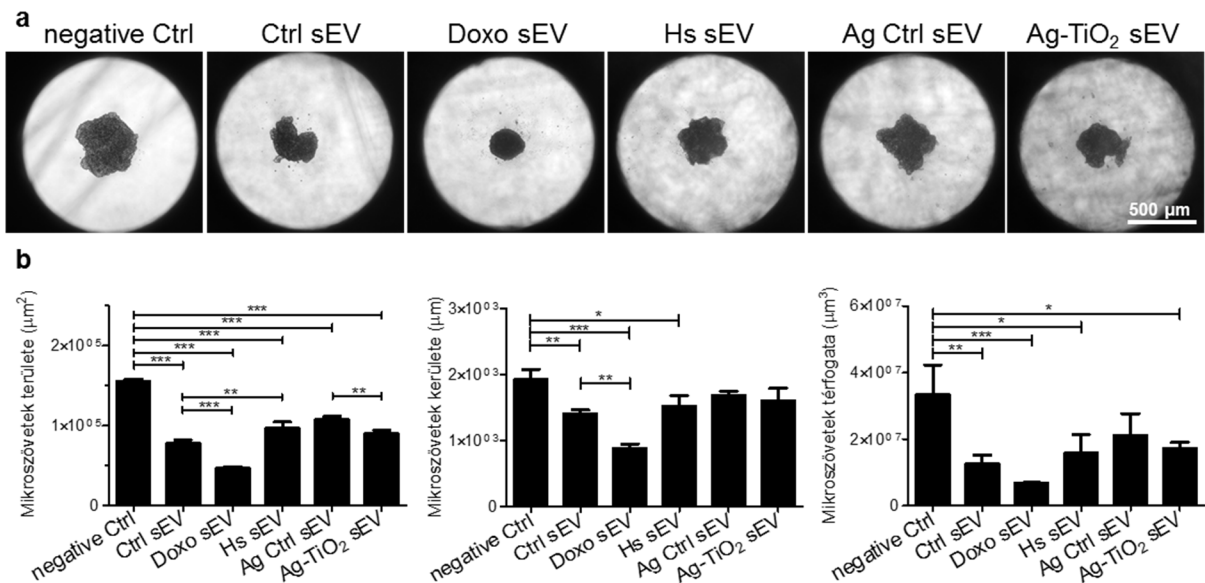
4.2.3.4 Az sEV-k mikroszövetképzést elősegítő hatása nem függ az sEV-típustól

Az IPA-predikciók szerint mind az öt sEV-csoport aktiváló hatást gyakorolhat olyan 'Biofunkciókra', amelyek egy 3D-s sejnterakciós mátrix kialakulását segíthetik elő. Ilyen 'Biofunkció' többek közt, a 'Sejtek aggregációja' vagy az 'ECM-képzés' (12. ábra). A különböző sEV-k aktiváló hatásának intenzitása viszont eltéréseket mutat, például a 'Sejtek aggregációjára' prediktált aktiváció a Doxo és a Hs csoportban a legerősebb.

Ezen *in silico* predikciókat is teszteltük *in vitro* kísérletekben. Az *in vivo* körülmények imitálása végett, létrehoztunk egy leegyszerűsített 3D-s tumormátrix modellt, ahol MSC, vagy MEF sejteket és B16F1 sejteket tenyésztettünk együtt függőcsepp lemezekben. A kétféle sejttípust 1:1 arányban alkalmazva (5.000 sejt/lyuk) 72 h-n át követtük a mikroszövetek kialakulását sEV- és DPBS-kezelések mellett. A mikroszövetekről készült képeket az AnaSP szoftver segítségével elemeztük, amelyet szferoidok automatikus képanalízisére fejlesztettek. A kísérletek során minden sEV-csoport elősegítette a mikroszövetképzést, azonban a legkisebb és legkompaktabb struktúrák a Doxo sEV-kezelés esetén jöttek létre (13. ábra). Ez azt jelenti, hogy a felszín-térfogat arány magasabb volt az sEV-indukált mikroszöveteknél, amely fokozhatja az oxigén, a növekedési faktorok és a tápanyagok felvételét, ráadásul kompaktabb struktúrák esetén a gyógyszerek penetrációja is mérséklődhet.



12. ábra. Az sEV-molekulák 'Sejtek aggregációjára' és 'ECM-képzésre' gyakorolt szabályozó hatásának IPA-predikciója. Az ábrákon minden szabályozó fehérjét feltüntettünk. A hozzájuk tartozó oszlopdiagramok a normalizált expressziós értékeket mutatják minden sEV-csoportban. Az sEV-csoportok neveivel ellátott színes szimbólumok a vezikulák prediktált szabályozó hatását jelzik a vizsgált 'Biofunkción'.



13. ábra. MSC-B16F1 ko-kultúrák mikroszövet-képzése. (a) A kialakult mikroszövetek reprezentatív képei 72 h-sEV-kezeléseket követően. (b) Az oszlopdiagramok a mikroszövetek területére, kerületére és térfogatára vonatkozó statisztikáit mutatják számtani közép+szórás értékekkel (n=3); *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5. Diszkusszió

Napjainkban számos olyan közlemény jelent meg, amely a tumorok makro- és mikrokörnyezetében az exoszómák közvetítő szerepét hangsúlyozza a tumorgenezis, tumornövekedés, metasztázisképzés, angiogenesis és immunmoduláció folyamataiban. Azonban még kevésbé ismert, hogy a terápia-indukálta stressz milyen hatást gyakorolhat a tumorsejtek vezikuláris kommunikációjára. E tanulmányban a mikrokörnyezeti változások hatását vizsgáltuk a tumorsejtek sEV-mediált kommunikációján, és azt tapasztaltuk, hogy a citosztatikus, hő- és oxidatív stressz módosítja az NPC- és a melanómaeredetű sEV-k molekulakészletét, ezáltal a recipiens, tumormátrix sejtekre gyakorolt funkcionális hatását is.

Bemutattuk, hogy az sEV-k, mint komplex információs csomagok számos szignálútvonalban részt vehetnek. A tény, hogy egy vezikuláris molekuláris mintázat a sejtek homeosztatikus hálózatát számtalan ponton befolyásolhatja, az sEV-funkciók óriási diverzitásáról árulkodik. Tehát, a vezikuláris molekulák százai, a recipiens sejtekben ezernyi funkcionális hatással bírhatnak, melynek végkimenetele kiszámíthatatlan.

Jelen esetben, az IPA-funkciók egyedi kombinációjával végzett bioinformatikai analízisek révén, sikeresen prediktáltuk a vizsgált sEV molekuláris mintázatok (ötféle kezeléssel előidézve) funkcionális hatásait. Ismereteink szerint, ez a kísérleti elrendezés alkalmas a vezikuláris szállítmány átvitelének és funkcionális aktivitásának modellezésére a recipiens sejtekben. Bemutattuk, hogy az útvonal analízisek jó megközelítéssel prediktálhatják a terápia-indukálta stresszválaszokat, mely arra utal, hogy az *in silico* analízisek nemcsak a kutatásban, hanem a klinikumban is hasznosak lehetnek.

E tanulmány részletes adatokkal szolgál az NPC-eredetű sEV-k doxorubicin-, és Ag-TiO₂-hatás alatt kialakult miRNS-készletéről, jellemzi a melanómaeredetű sEV-k doxorubicin-, hő- és Ag-TiO₂-indukálta molekuláris mintázatát és részletesen bemutatja a recipiens, tumormátrix sejtek, melanóma sEV-k indukálta válaszmintázatait is. Ezen adatok nagymértékben hozzájárulnak az NPC- és a melanómaeredetű sEV-k molekuláris és funkcionális komplexitásáról, valamint mikrokörnyezet-függő változatosságáról szerzett ismereteink bővítéséhez, valamint a rákos betegségek patogenezisének és terápiás válaszainak megértéséhez. Emellett rávilágítanak a terápiás kezelések, például a kemoterápia közvetett hatásaira, melyek befolyásolhatják a kezelt sejtek intercelluláris kommunikációját.

Eredményeinkből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy e fokozottan védett információs csomagok molekuláris mintázata nagymértékben függ a mikrokörnyezeti körülményektől, beleértve a terápiás stressztényezőket is. Egy módosult sEV-szállítmány nemcsak meglévő szignálútvonalakat serkenthet, vagy gátolhat, *de novo* útvonalakat is aktiválhat, így egy egyedi célsejt-specifikus válaszmintázatot alakíthat ki a recipiens sejtekben. Jelen kutatás és szakirodalmi adatok is arra utalnak, hogy a tumorsejtek komplex, sEV-mediált intercelluláris kommunikációjának megváltozása kiemelt figyelmet érdemel a terápia-indukált gazdaválaszok körében, amely a kezelés hatékonyságát is befolyásolhatja.

6. Új eredmények

1. A különféle stressztényezők az NPC- és a melanómasejtek sEV-termelését is serkentik, bár eltérő mértékben.
2. Az NPC sEV-k hordozta miRNS-ek száma citosztatikus és oxidatív stressz esetén is a sokszorosára nő. A melanóma sEV-k szintén sok mikrokörnyezet-függő molekulát hordoznak, de miRNS- és fehérjekészletük változása minden stressz-típusnál egyedi mintázatot mutat. E tanulmányban a melanóma sEV-k fehérjetartalmának állandó elemeit is azonosítottuk.
3. A melanómasejtek esetén, úgymint az emlőkarcinóma sejteknél, az sEV-k a doxorubicint is átvihetik, azonban az Ag-TiO₂ nanopartikulumok nem csomagolódnak be a kis vezikulákba.
4. Az sEV-szállítmány átvitele és funkcionális aktivitása az IPA-funkciók révén, egy *in silico* modellezhető folyamat.
5. A tumoreredetű sEV-k különféle molekuláris mintázatai, melyek a mikrokörnyezeti tényezők függvényében alakulnak ki, változatos funkcionális jellemzőkkel bírnak.
6. Az NPC sEV-k miRNS-tartalma elősegítheti a tumorprogressziót, azonban stressz esetén gátló hatásokkal bírhat. Ugyanakkor a melanómasejtek sEV-mediált kommunikációja képes alkalmazkodni a mikrokörnyezeti körülményekhez.
7. A tumorsejtek sEV-mediált kommunikációja a recipiens sejtekben indukált, egyedi válaszmintázatok révén a mikrokörnyezeti tényezők változását tükrözi.
8. Ugyanazon melanóma sEV-populáció, vagyis ugyanazon molekuláris szállítmány a különböző típusú recipiens sejtekben ellentétes hatásokat is kiválthat.
9. Saját fejlesztésű *in silico* modellünk alkalmas lehet az sEV-indukált hatások predikciójára, amely nemcsak a kutatás, de a klinikum területén is hasznos lehet.

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Buzás Krisztinának** doktori tanulmányaim során nyújtott iránymutatásáért, türelméért és bátorításáért. Szeretném megköszönni, hogy bevezetett a tudományos kutatás világába és, hogy megtanított a kutatók fejével gondolkodni.

Köszönöm **Dr. Horváth Péternek**, a Mikroszkópos Képfeldolgozó és Gépi Tanulási Csoport, valamint a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet vezetőjének a munkám során nyújtott szakmai támogatását.

Szeretném megköszönni kollégáimnak, **Dobra Gabriellának, Gyukity-Sebestyén Edinának, Pintér Lillának és Kovács Máriának** a folyamatos szakmai, technikai és személyes támogatást. Segítségük nélkül e disszertáció sosem készülhetett volna el. Emellett köszönöm a Mikroszkópos Képfeldolgozó és Gépi Tanulási Csoport további tagjainak munkáját és támogatását is.

Köszönöm a kutatóegység, a Biokémiai Intézet és az egész kutatóközpont minden munkatársának a támogatását, akik a technikai hátteret biztosították, akik konstruktív ötletekkel segítettek munkámat, vagy akikhez bármikor fordulhattam egy-egy hiányzó vegyszer, laboráru, vagy műszer ügyében.

Hálás vagyok továbbá együttműködő partnereinknek, akik hozzájárultak a kutatómunkámhoz, és lehetővé tették a közös eredményeink publikálását. Külön köszönet illeti **Dr. Filippo Piccinin**it, aki bevezetett a 3D sejtkultúrák rejtelseibe.

Kutatásaink nem valósulhattak volna meg anyagi támogatás nélkül sem, munkámat a GINOP-2.3.2-15-2016-00015; GINOP-2.2.1-15-2017-00052 és az NKFI-6-K-11493 pályázatok, valamint a Szegedi Tudományegyetem Open Access alapja támogatta.

Végül szeretném megköszönni kedvesemnek, **Váradi Zoltán Árpádnak** nemcsak az informatikai segítséget, de a szüntelen buzdítást, személyes támogatást is. Hálás vagyok családomnak és rokonaimnak a biztatásukért, akik sokat nélkülöztek az elmúlt években.